

Die Wirkung von Bakterien auf tote Zellen.

Inaugural-Dissertation

der

hohen philosophischen Fakultät der Universität Leipzig

zur

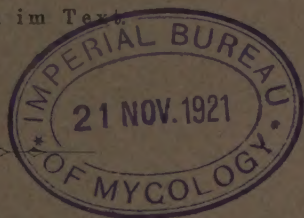
Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt von

Arthur Henry Reginald Buller B. Sc. (Lond.)

aus Birmingham (England).

Mit 3 Figuren im Text.



Leipzig-R.

Druck von Oswald Schmidt.

1899.

Die Wirkung von Bakterien auf tote Zellen.

Inaugural-Dissertation

der

hohen philosophischen Fakultät der Universität Leipzig

zur

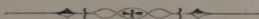
Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt von

Arthur Henry Reginald Buller B. Sc. (Lond.)

aus Birmingham (England).

Mit 3 Figuren im Text.



Leipzig-R.

Druck von Oswald Schmidt.

1899.

Seinen lieben Eltern

in Dankbarkeit

gewidmet.

Inhalt.

	Seite
Einleitung	5
Die active Durchwanderung von Zellwänden durch Bakterien . . .	9
Experimente mit Mischculturen	10
Experimente mit Reinculturen	15
Experimente mit Membranen	16
Experimente mit Cellulose auflösenden Bakterien	19
Allgemeine Betrachtungen	24
Die Beziehungen zwischen Pilzen und Bakterien hinsichtlich ihres Eindringens in Zellen	33
Die Einwirkung von Bakterien auf den Inhalt von Zellen von aussen her mit Hülfe von Enzymen	36
Das Eindringen von Bakterien durch Eischalen	41

Einleitung.

Es kann keine Frage sein, dass von all den Organismen, die in der Natur an dem grossen Zerstörungswerke der organischen Substanzen teilnehmen, die Bakterien die wichtigsten sind. Irgend eine andere Gruppe von chlorophyllfreien Organismen könnte untergehen, ohne dass dadurch eine Unterbrechung in dem grossen Kreislaufe entstünde. Ohne saprophytische Bakterien jedoch würde sich die organische Materie allmählich auf der Erde anhäufen, und das gegenwärtige Gleichgewicht zwischen Entstehen und Vergehen, das wir der vereinigten Thätigkeit aller lebenden Organismen verdanken, würde gestört werden. Für die Vervollständigung des die organische Substanz zersetzenden Naturprozesses sind saprophytische Bakterien ebenso unentbehrlich, wie die autotrophischen Pflanzen für den Entstehungsprozess. Nur dem Vorhandensein der ersteren verdanken wir die Aufrechterhaltung des organischen Gleichgewichtes auf der Erde. Diese zerstörenden Mikroorganismen erscheinen als recht geeignet für die Rolle, die sie spielen durch ihre geringe Grösse, durch die Art und Weise ihrer Verbreitung, die Schnelligkeit ihrer Vermehrung und durch die mannigfachen Zersetzungen, die sie hervorzurufen im stande sind.

Die pflanzlichen und tierischen Zellen und Gewebe müssen eine Reihe von chemischen und physikalischen Veränderungen durchmachen, ehe es zu ihrer gänzlichen Auflösung kommt. Zur Erreichung dieses Zieles wirken dann in der Regel verschiedene Bakterien gleichzeitig zusammen oder auch nach einander.

Für die Wirkung der Bakterien ist wohl zu beachten, dass die pflanzlichen Zellen zumeist eine solide Zellwand besitzen. Wie Miyoshi¹⁾ dargethan, vermögen saprophytische Fadenpilze auf einen dirigierenden chemischen Reiz hin,

¹⁾ Miyoshi, Die Durchbohrung von Membranen durch Pilzfäden. *Jahrb. f. wiss. Bot.* Bd. 28. 1895, p. 269.

Zellwände ziemlich schnell zu durchdringen. Unsere Kenntnis von dem Eindringen der Bakterien durch Zellwände ist aber nur mangelhaft. Wie nun auch ein solches Eindringen vor sich gehen mag: es ist ein höchst bedeutender Schritt in dem Verwesungsprozesse, gleichwie in dem Verlaufe von Pflanzenkrankheiten, bei denen Bakterien eine Rolle spielen. Denn lediglich durch die Zellwände hindurch können die Bakterien in direkte Berührung mit dem Zellinhalt gelangen. Das Hindurchgehen von Bakterien durch Membranen ist auch in der tierischen Pathologie von besonderer Wichtigkeit. Doch scheint es, als ob wir über die Art und Weise, in der sich diese Erscheinung vollzieht, gerade so in Unkenntnis sind wie über ihre Ursachen.

Meine Aufgabe hat sich auf die Untersuchung der Beziehung von Bakterien zu toten Zellen erstreckt. Ich habe mich bemüht festzustellen, in wie weit Bakterien in tote Zellen 1) vermittels ihrer eigenen Thätigkeit, 2) mit Hülfe von Pilzen eindringen und 3) ob da, wo ein Eindringen nicht stattfindet, gewisse Bakterien im stande sind, den Zellinhalt durch Vermittlung von Enzymen zu zerstören, die durch die Zellwände diosmieren.

Was für Veränderungen eine tote Zelle auch erfahren mag: die Endprozesse der Verwesung werden fraglos die Zerstörung ihrer Zellmembran und ihres Zellinhaltes herbeiführen. Dies kann man z. B. in dem Detritus aus dem Schlamm von Teichen wahrnehmen, in dem pflanzliche Gewebe verwesen. Einige Zellwände sind widerstandsfähiger als andere; alle jedoch müssen der Zerstörung anheimfallen, denn binnen längerer oder kürzerer Zeit sind sie zerfallen.

Wie schon bemerkt, handelt es sich aber nicht nur um die Durchdringung von toten, sondern bei den Parasiten auch um das Durchdringen von Membranen lebender Zellen. Noch vor wenigen Jahren glaubte man, dass parasitische Bakterien ihre Angriffe ausschliesslich gegen Tiere richteten. Im Jahre 1882 erklärte Robert Hartig¹⁾ in seinem Lehrbuch

¹⁾ Hartig, Lehrbuch der Baumkrankheiten. 1882, p. 27.

der Baumkrankheiten, dass Bakterien keinerlei Erkrankungen von Pflanzen verursachen. Seit dieser Zeit jedoch hat man solche Erkrankungen entdeckt, und ihre Zahl nimmt allmählich zu. Erwin Smith¹⁾ hat sogar ausgesprochen, dass wahrscheinlich ebenso viele bakterielle Krankheiten von Pflanzen, wie von Tieren existieren. Bis jetzt sind derartige Erkrankungen aber nur bei Phanerogamen beobachtet. In der Regel scheinen aber intakte Pflanzen parasitischen Bakterien erfolgreich Widerstand zu leisten, und nur dadurch dass die letzteren durch offene Verletzungen eindringen, die von Insekten oder Schnecken u. s. w. herrühren, vermögen sie festen Fuss zu fassen. Bei der als „Cabbage Rot“ bezeichneten Kohlkrankheit²⁾ jedoch ist eine vorhergehende Verletzung nicht nötig, denn das Bakterium, *Pseudomonas campestris* (Pammel), tritt in das Zellgewebe der Blätter mit Hülfe der Wassertropfen ein, die aus den Wasserporen ausgeschieden werden. Haben einmal parasitische Bakterien begonnen, sich in einer Pflanze zu entwickeln, so beschränken sie sich nicht auf die intercellularen Räume, sondern nehmen ihren Weg durch die Zellwände hindurch und zerstören rasch den Zellinhalt.

Dagegen leben die Knöllchenbakterien bekanntlich in mutualistischer Symbiose in den Wurzeln der Leguminosen. Nach Prazmowski³⁾ und Frank⁴⁾ findet das Eindringen in die Pflanzen vermittelt Infektionsfäden statt, welche die Kolonien befähigen in die Rinde einzudringen, in der sich günstige Lebensbedingungen für sie vorfinden.

Russel⁵⁾ und Lominsky⁶⁾ haben untersucht, welche Wir-

¹⁾ E. Smith, The bacterial diseases of plants: a critical review of the present state of our knowledge. The American Naturalist. 1896, p. 627.

²⁾ E. Smith, *Pseudomonas campestris*. The cause of a brown rot in cruciferous plants. Centralbl. f. Bakt. II. Abteil. III. Bd. 1894, p. 411.

³⁾ Prazmowski, Die Wurzelknöllchen der Erbse. Versuchsstats. XXXVII. 1890, p. 211.

⁴⁾ Frank, Über die Pilzsymbiose der Leguminosae. Landw. Jahrb. Bd. 19. 1890, p. 530.

⁵⁾ Russel, Bacteria in their relation to vegetable tissue. Johns Hopkins Hospital Reports Vol. III. 1893, p. 223.

⁶⁾ Lominsky, Auszug im Centralbl. f. Bakt. Bd. VIII. 1890, p. 325.

kung das Impfen von Bakterien im Zellgewebe von höheren Pflanzen erzeugt. Russel kam zu dem Resultat, dass die verschiedenen Microorganismen längere Zeit in den Geweben lebensfähig bleiben. Lominsky verwendete Bakterien, die für Tiere pathogen sind, und erhielt ein ähnliches Resultat. In einigen Fällen fanden Russel sowie Lominsky, dass die Bakterien in das Innere von Zellen eingedrungen waren.

In einer neueren Arbeit hat Zinsser¹⁾ Experimente beschrieben, bei denen er verschiedene ober- und unterirdische Teile von Leguminosen mit Knöllchenbakterien impfte. Er fand, dass die Bakterien unter diesen Umständen allmählich abstarben. Er führte auch einige Impfversuche²⁾ mit anderen Bakterien aus, die für Pflanzen nicht pathogen sind und gelangte zu einem allgemeinen Resultate, das dem von Russel und Lominsky erhaltenen gleich kam. Die Bakterien starben allmählich ab, ohne sich von der Einimpfungsstelle her über eine grössere Strecke verbreiten zu können.

Celakowsky³⁾ hat Experimente über die Einschliessung von lebenden Bakterien in Plasmodien der Myxomyceten angestellt. Sie ergaben, dass die verwendeten Bakterien nicht sofort getötet wurden, sobald sie in eine Vacuole eingeschlossen oder in das Protoplasma eines Plasmodium eingelagert waren. Er konnte im Gegenteil in einem Falle⁴⁾ nachweisen, dass Bakterien nach der Aufnahme in das Protoplasma noch sechs Stunden lang lebten. Ferner machte er die Bemerkung (*loc. cit.*), dass Bakterien in Nahrungsvacuolen sich noch zwei Tage nach erfolgter Einschliessung bewegten, und er kam zu dem Resultat, dass sich die Bakterien in einigen Vacuolen tatsächlich vermehrt hatten. Daher können wir kaum an-

¹⁾ O. Zinsser, Über das Verhalten von Bakterien, insbesondere von Knöllchenbakterien in lebenden pflanzlichen Geweben. *Jahrb. f. wiss. Bot.* Bd. 30. 1897, p. 430.

²⁾ *loc. cit.* p. 437.

³⁾ L. Celakowsky, Über die Aufnahme lebender und toter verdaulicher Körper in die Plasmodien der Myxomyceten. *Flora* 1892. *Ergänzungsband.* p. 218.

⁴⁾ *loc. cit.* p. 221.

nehmen, dass die in Rede stehenden Vacuolen Bakterien tötende Substanzen enthielten. Dass der Zellsaft höherer Pflanzen keine so beschaffenen Substanzen aufweist, scheint sich aus der Arbeit von Russel ¹⁾ zu ergeben, welche darlegte, dass verschiedene Arten von Bakterien in ausgepresstem Zellsafte sich vermehrt hatten. Im allgemeinen jedoch gewährt der gewöhnlich saure Zustand des Zellsaftes eine ungünstige Lebensbedingung.

Die aktive Durchwanderung von Zellwänden durch Bakterien.

Diese Frage ist bisher kaum kritisch behandelt worden. Das Eindringen von Bakterien durch die Zellwände toter Zellen wurde stillschweigend angenommen, ohne dass man einen Versuch gemacht hat, das Wesen dieser Erscheinung oder die Bedingungen des Eindringens kennen zu lernen. Im allgemeinen glaubt man, dass während des Lebens einer Zelle (z. B. von Spirogyra) die Widerstandsfähigkeit des lebenden Protoplasmas und in gewissem Grade der Säuregehalt des Zellsaftes die Angriffe der Bakterien vereiteln. Anderseits scheint man jedoch der Meinung zu sein, dass sofort nach dem Absterben der Zelle die saprophytischen Bakterien im stande sind, die Zellwände zu durchdringen und so eine rasche Zerstörung des Zellinhalts herbeizuführen. Wie es sich zeigen wird, dürften meine Experimente geeignet sein, diese letztere Anschauung zu modifizieren.

Was die Art und Weise des Eindringens betrifft, so wissen wir nicht, ob Bakterien einzeln wie die Pilze Zellwände durchdringen können, oder ob dies nur durch die vereinigte Thätigkeit von Kolonien zu stande kommt. Es ist ebenfalls noch nicht nachgewiesen, ob das Durchbohren lediglich auf mechanischem Wege stattfindet, oder ob sich dabei mechanische und chemische Einwirkungen vereinigen.

Das Eindringen von Pilzen durch Zellmembrane wird, wie

¹⁾ loc. cit. p. 250.

Miyoshi¹⁾ dargethan hat, in hohem Grade durch den Chemotropismus gefördert. Die Pilze folgen dem chemischen Reize der Inhaltstoffe, wenden sich nach der den Reiz erregenden Substanz hin und bohren sich durch die Zellwand. Ob chemische Reize in analoger Weise das Einwandern von Bakterien veranlassen, ist noch nicht untersucht.

Experimente mit Mischkulturen.

Bei diesen Experimenten wurden verschiedene Zellen in Wasser- und Nährstofflösungen der Einwirkung von einem Bakteriengemisch ausgesetzt. Von diesem fanden einige Arten, wie ich im Verlaufe der Experimente zu beachten Gelegenheit hatte, in den Zellen einen geeigneten Boden für ihre Entwicklung. Es war anzunehmen, dass möglicherweise wenigstens eine der vielen vorhandenen Species befähigt sein würde, in die toten Zellen einzudringen. Benutzt wurden solche Zellen und Zellgruppen, die bequem unter dem Mikroskop betrachtet werden können, nämlich Fäden von *Spirogyra* und *Cladophora*, Blätter von *Catharinia*, *Funaria* und *Hymenophyllum*. Diese wurden in Alkohol abgetötet, in destilliertem Wasser gewaschen und darauf in Lösungen gelegt, die ein Gemisch von Bakterien enthielten. Vor dem Einlegen in die Lösungen, welche sich in mit Baumwolle verschlossenen Flaschen befanden, wurden die Fäden der Algen in kurze Stücke zerteilt, die Spitzen der Moosblätter entfernt und die Blätter von *Hymenophyllum* in kleine Stücke zerschnitten, um dadurch geöffnete Zellen zu bekommen, in denen sich die Bakterien vermehren konnten, so dass sie dann in beträchtlicher Anzahl auf den Membranen von noch unverletzten Zellen vorhanden waren. Verwendet wurden Leitungswasser und Lösungen von 1,00 % Fleischextrakt oder 0,5 % Fleischextrakt + 0,5 % Pepton, zum Teil mit Zusatz von Zucker. Die Infizierung wurde mittelst Teichschlamm, Leitungswasser, Luft etc. bewirkt. Das Material wurde ab und zu unter dem Mikroskop untersucht.

¹⁾ Miyoshi, Die Durchbohrung von Membranen durch Pilzfäden. *Jahrb. f. wiss. Bot.* Bd. 28. 1895. p. 269.

Als allgemeines Resultat dieser Experimente ergab sich, dass Bakterien nicht in die unbeschädigten Zellen eindrangen. Wo aber die Zellen bei der Zurichtung des Versuchsmaterials geöffnet oder zerrissen waren, hatten Bakterien ihren Weg hineingefunden, waren oft in grosser Anzahl vorhanden und zehrten nachweislich den Zellinhalt auf. Die benachbarten unverletzten Zellen blieben bakterienfrei, sogar als die Experimente einige Wochen und Monate in Gang waren. Dass die Zellen von Bakterien frei waren, wurde bewiesen erstens durch die Thatsache, dass keine Bakterien darin zu sehen waren, und zweitens dadurch, dass der Zellinhalt keine so rasche und auffällige Veränderung erlitt, wie es sich bei verletzten Zellen beobachten liess, in die Bakterien Eingang gefunden hatten.

Die angeführten Resultate erschienen für das sämtliche Material mit Ausnahme der *Funaria* gewiss. Im letzteren Falle kam ich anfangs in Verlegenheit, als ich die Entdeckung machte, dass um viele Blätter herum teils einzelne Zellen, teils einige wenige zusammenhängende Zellen zerstreut lagen, die mit Bakterien angefüllt waren. Diese waren oftmals höchst bewegliche Micrococcen, bisweilen jedoch auch Stäbchen. Die Wandungen der Bakterien enthaltenden Zellen schienen oft unversehrt. Bei sorgfältigen Untersuchungen vermochte ich aber zumeist nachzuweisen, dass die Zellwände dennoch verletzt waren. Besonders deutlich traten die Risse in der Zellwand hervor in Versuchen, bei denen die Blätter in eine Lösung von 0,5 % Zucker und 0,5 % Pepton gegeben hatten. Ich zweifelte nicht, dass die Bakterien da, wo es ihnen gelang, in eine Zelle hinein zukommen (siehe Fig. 1) ihren Weg durch solch' einen Riss nahmen. Die vielleicht beim Abtöten des Materials in Alkohol entstandenen Risse erstreckten sich in der Richtung der Längsachse des Blattes gewöhnlich über eine, seltener über zwei Zellen. Drei Wochen nach dem Beginne des Experiments liessen sich in den *Funaria*-Blättern drei Arten von Zellen unterscheiden, 1) dunkel aussehende von Bakterien erfüllte Zellen mit wenig oder keinem plasmatischen Zellinhalt, 2) leer er-

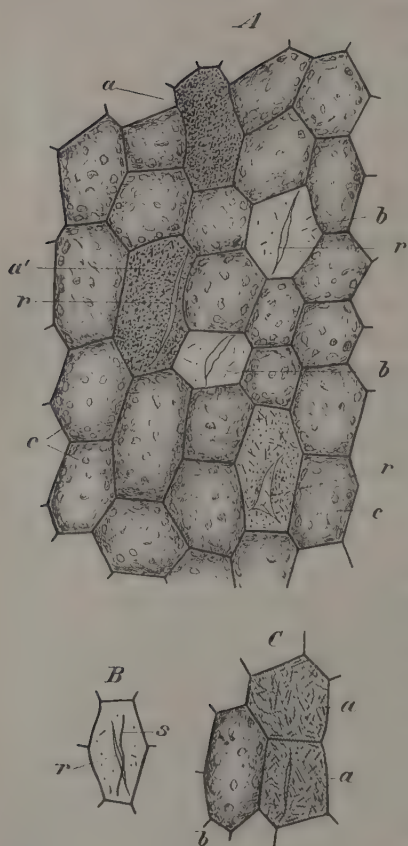


Fig. 1. A. Teil eines Blattes von *Funaria hygrometrica*. aa' Zellen mit Bakterien erfüllt. Bei a' ist ein Riss r zu sehen. b Zelle ohne Zellinhalt beinahe frei von Bakterien. cc Zellen die noch Zellinhalt besitzen und von Bakterien frei sind. r Riss in der Zellwand.

B. Zelle mit einem Riss r. In der Zelle sind wenige kleinere Bakterien zerstreut und ein grosses bewegliches Spirillum s, welches zu lang scheint, um seinen Weg nach aussen zu finden.

C. aa Zellen mit stabförmigen Bakterien. b Zelle frei von Bakterien.

scheinende Zellen, welche die Bakterien offenbar nach Verbrauch des Zellinhaltes bereits gänzlich verlassen hatten und 3) Zellen mit unverletzten Wänden, die ihren Zellinhalt bewahrt hatten und nachweislich frei von Bakterien waren. Die Thatsache, dass diese letzteren Zellen auch dann frei von Bakterien blieben, wenn sie an verletzte Zellen anstiessen, die bereits eine Menge von Bakterien enthielten, beweist ganz klar, dass unter diesen Bedingungen der Experimente die Bakterien nicht im stande waren, die Zellwand vermittelst eigener Thätigkeit zu durchdringen.

Dass die bei meinen Experimenten benutzten Zellen einen geeigneten Boden für das Wachstum

von Bakterien bieten, ging aus der grossen Zahl der letzteren hervor, die sich in den beschädigten Zellen ansammelten. Die Zellen von *Funaria* nahmen derartige Mengen von Bakterien auf, dass sie bei schwacher Vergrösserung unter dem Mikroskop dunkel erschienen. Hinzugefügt sei noch, dass der Inhalt verletzter Zellen langsam verschwand, indem er von den Bakterien aufgezehrt wurde.

Wie bereits erwähnt, wird das Eindringen von Fadenpilzen durch Zellmembranen durch Chemotropismus begünstigt. Falls das Wandern der Bakterien durch Zellwände hindurch von denselben Ursachen wie das der Fadenpilze abhängt, ist es leicht zu verstehen, dass Bakterien, die einzudringen befähigt sind, nicht eindringen, sobald der nötige chemische Reiz nicht vorhanden ist. Daher muss man sich fragen, ob solcher bei den vorliegenden Experimenten im Spiele war. Die folgenden Beobachtungen behandeln diese Frage.

Als eine *Spirogyra*-Zelle derart durchschnitten worden war, dass ungefähr $\frac{3}{4}$ der Zelle in der Form eines Cylinders übrig blieben, wurden Bakterien in ähnlicher Weise angezogen wie durch eine Capillare, in der sich Reizstoffe befinden. Es ist daher sicher, dass der Inhalt der verletzten *Spirogyra*-Zellen einen chemischen Reiz auf die beweglichen Bakterien ausübt. Das Gleiche können wir für den Inhalt der unbeschädigten Zellen folgern. Der reichliche Stärkegehalt, den die Algenzellen zuerst aufweisen, nahm oft allmählich ab. Da kein Grund zu der Annahme vorliegt, dass die Stärke die Zellen in einer anderen Form als der von Zucker verliess, so muss während ihres Verschwindens auf die ausserhalb der Zellen befindlichen Bakterien ein chemischer Reiz ausgeübt worden sein, denn Bakterien sind empfindlich für das Vorhandensein von Zucker. Zum Teil war es wahrscheinlich durch Diffusion von Nahrungsstoffen aus den Zellen heraus hervorgerufen, dass die unbeweglich an der Zellwand klebenden Bakterien sich allmählich so stark vermehrten, dass sie die Algenzellen mit einer Hülle von Mikroorganismen umgaben. Ich beobachtete, dass gewisse bewegliche Spirillen sich oft ziemlich schnell gegen einen

Spirogyra-Faden hin bewegten. Oft wurde dabei ein Spirillum von der schleimigen Aussenfläche einer der Algenzellen festgehalten und drehte sich dann um diesen Fixierpunkt herum.

Die Thatsache, dass saprophytische Pilze leicht in tote Zellen eindringen, die einen reichen Inhalt besitzen, beweist, dass der Zelleninhalt im stande ist, einen dirigierenden chemischen Reiz auf Pilze auszuüben, die in seine Nähe gelangen. In ihrer chemotropischen Empfindlichkeit ähneln die Bakterien den Pilzen. Daher scheint es eine richtige Folgerung zu sein, wenn man annimmt, dass der Inhalt von toten Zellen, wie z. B. der von *Cladophora* und *Spirogyra*, auf die benachbarten Bakterien einen chemischen Reiz ausübt. Bei einigen später ausführlicher zu beschreibenden Experimenten waren Pilzsporen und Bakteriengemische in dünne Wasserschichten gebracht, welche die Oberfläche von Haaren von *Heracleum*, Moosblättern etc. bedeckten. Nur die Pilze drangen in die Zellen ein. In diesem Falle konnte kein Zweifel herrschen, dass von dem Zellinhalt ein chemischer Reiz ausging, dass aber die Bakterien im Gegensatze zu den Pilzen aus denselben keinen Vorteil zu ziehen vermochten.

Dass bei meinen Versuchen die Bakterien die Membranen nicht durchdrangen, ist sicherlich nicht auf das Fehlen eines dirigierenden chemischen Reizes zurückzuführen, sondern vielmehr auf den Umstand, dass die Bakterien nicht befähigt waren, den ihrem Vordringen sich entgegensetzenden Widerstand der Zellwände zu überwinden. Dass es saprophytische Bakterien geben mag, die im stande sind, in tote Zellen einzudringen, ist nicht zu leugnen. Das Vorhandensein solcher Mikroorganismen liesse sich vielleicht schon auf Grund unserer Kenntnis von den Leguminose-Bakterien erwarten, ferner, wie bereits erwähnt, auf Grund der von Russel und Lominsky angestellten Impfungs-Experimente, wie auch infolge des Vorkommens von vielen Arten pathogener Bakterien, die als Krankheitserreger bei den Erkrankungen der höheren Pflanzen von Zelle zu Zelle gehen dürften.

Der Hauptschluss, zu dem meine Experimente führen, ist der, dass viele Arten von saprophytischen Bakterien, selbst wenn

der Zellinhalt einen geeigneten Boden für das Wachstum abgiebt und einen dirigierenden chemischen Reiz ausübt, nicht im stande sind, in die Zellen einzudringen und so in Berührung mit dem Zellinneren zu kommen, weil die Zellwänden ihnen ein unüberwindliches Hindernis bieten.

Experimente mit Reinkulturen.

Bei diesen Versuchen wurden Spirogyra-Zellen der Einwirkung von *Bacterium megaterium* und einem termo-ähnlichen *Bacterium* in Reinkulturen unterworfen. Die verwendeten Kultursalze bestanden aus Monokaliumphosphat, Calciumnitrat, Kaliumnitrat, Magnesiumsulphat und Chlorecalsium in der gebräuchlichen Zusammensetzung unter Zufügung von 0,15 gr. $\%$ Ammoniumnitrat. Mit *Bacterium megaterium* wurden die folgenden vier Kulturflüssigkeiten verwendet:

1. Kultursalze + 0,5 $\%$ Pepton.
2. " + 2,0 $\%$ Zucker.
3. " + 0,15 $\%$ lösliche Stärke + 0,5 $\%$ Pepton.
4. " + 0,15 $\%$ lösliche Stärke.

Mit dem termoähnlichen Bakterium:

1. Kultursalze + 0,5 $\%$ Pepton.
2. " + 2,0 $\%$ Zucker + 0,15 $\%$ lösliche Stärke.

Zur Anwendung kamen kleine Erlenmeyer'sche Kolben, und in jedem wurde der Kulturflüssigkeit eine geringe Menge von stärkehaltigen Spirogyra-Fäden zugesetzt. Die Kulturflüssigkeit wurde in der gewöhnlichen Weise neutralisiert, sterilisiert und infiziert.

Der Erfolg dieser Experimente war bezüglich des Eindringens in die Zellen oder der Wirkung auf die Zellwände nach Verlauf von sechs Wochen ein negativer. Die Bakterien waren weder in die unverletzten Zellen eingedrungen, noch schien die Cellulose, obgleich leicht angeschwollen, angegriffen zu sein. Hiernach ist es wahrscheinlich, dass weder *Bacterium megaterium* noch das termoähnliche *Bacterium* befähigt sind, durch die Zellwand hindurch in tote Zellen zu gelangen.

Experimente mit Membranen.

Der chemotaktische Reiz, den der Inhalt toter Zellen auf Bakterien auszuüben vermag, ist ohne Zweifel sehr schwankend. Um sicher zu sein, dass in der That von der einen Seite einer Membrane aus auf Bakterien, die sich auf der anderen Seite der Haut befinden, ein starker chemotaktischer Reiz ausgeht, stellte ich Experimente an, deren Ausführung im folgenden beschrieben werden soll.

Der gebrauchsfertige Apparat war in allen seinen Teilen sterilisiert und von sterilisierter Luft umgeben. Er bestand aus einem Glasgefäß *v* (siehe Fig. 2) mit einem Kork *c*, durch dessen Mitte eine Glasröhre *t* führte. Diese letztere

war oben offen, am unteren Ende jedoch durch eine Membran *m* verschlossen, die mit Zwirn festgebunden war. Die Membran wurde von einem spaltfreien Epidermisstreifen gebildet, der von einer Zwiebelschale abgezogen worden war. Rings um die Membran befand sich eine Hülle von Nährgelatine *n*, geformt wie das Ende eines Reagensgläschens. Der Kork hatte drei

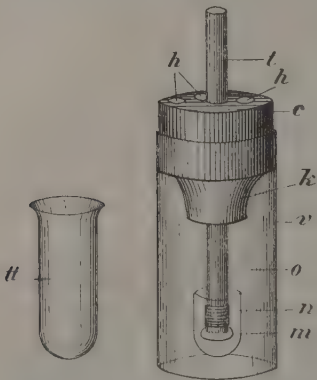


Fig. 2. $\frac{2}{3}$ der natürlichen Grösse.

bis vier Durchbohrungen *h*, die so mit Baumwolle verstopft waren, dass die Luft ungehindert in den Raum *o* eintreten konnte. Um den so vorgerichteten Apparat zu benutzen, wurde ein sehr feiner Glasstab mit einem abgerundeten Ende in eine Bakterienkultur getaucht und dann vorsichtig in die Glasröhre *t* eingeführt, bis das runde Ende des Stabes die Membran berührte. So wurden die Bakterien auf die eine Seite der Membran gebracht, während die andere Seite mit der sterilisierten Nährgelatine zusammenhing. Nach der Einführung der Bakterien wurde der Apparat auf eine Schale mit Wasser gesetzt,

darüber dann eine grosse im Inneren mit nassem Filtrierpapier ausgekleidete Glasglocke gestülpt, sodass auf diese Weise eine Feuchtkammer hergestellt war. Das alles geschah im Schutze eines durch längeres Ausdampfen staubfrei gemachten Glaskastens.

Die Vorbereitungen für ein Experiment gingen in folgender Weise vor sich. Die innere Epidermis einer Schale von *Allium cepa* wurde sorgfältig abgezogen, einen Tag oder länger in 96 % Alkohol gethan und dann, mit der Cuticula dem Glase anliegend, an dem unteren Ende der Glasröhre (t in der Fig.) festgebunden, um hier nun die Bakterien aufzunehmen. Die Membran war mit weissem vielfach um die Röhre gewundenen Zwirnfaden ¹⁾ befestigt. Die Röhre mit der daran angebrachten Membrane wurde dann ca. 8 Tage lang in Äther gelegt. Der Kork c war so konstruiert, dass bei k ein abgeschnittenes Reagenzgläschen tt über ihn geschoben werden konnte. Das Glasgefäss v mit dem Kork c und dem Reagenzgläschen tt wurde mittelst Trockenhitze von 150° C. eine Stunde lang sterilisiert. Der Apparat und das Gefäss mit der Röhre t kamen sodann in einen sterilisierten Glasarbeitsraum, die Röhre ward aus dem Äther herausgenommen, in sterilisiertem Wasser gewaschen und durch Schütteln von anhaftender Flüssigkeit befreit. Nunmehr wurde der Kork c von dem Gefäss abgehoben, das Reagenzgläschen auf einen kleinen sterilisierten Korkständer gestellt und das obere Ende der Röhre t soweit durch die Mitte des Korkes c gestreckt, dass sie die in der Figur angegebene Stellung einnahm. Ein wenig warme sterilisierte Gelatine die 1 % Fleischextrakt, 0,5 % Pepton und 5 % Rohrzucker enthielt, wurde darauf in ein Reagenzgläschen gegossen und dieses bei k auf dem Kork angebracht, wodurch die Membran gänzlich von Gelatine umgeben war. Sobald die Gelatine durch Abkühlung geronnen war, wurde der Kork mit dem Reagenzgläschen von dem Glasgefässe abgeschoben, und das

¹⁾ Bei allen meinen Experimenten verhinderte diese Befestigungsweise der Membran die Bakterien, zwischen der Glasröhre und der Membran hindurch in die Gelatine zu gelangen.

untere Ende des Reagenzgläschens in warmes sterilisiertes Wasser gehalten. Nach einigen Sekunden liess ich dann die Gelatinemasse, die an dem Ende der Röhre festhing, aus dem Reagenzgläschen herausziehen. Darnach wurde der Kork mit seiner Röhre *t* und der anhaftenden Gelatinemasse in die auf der Figur angezeigte Lage gebracht. Bei einigen dieser Arbeiten sah ich mich gezwungen, die Finger zu Hülfe zu nehmen. Diese suchte ich so gut wie möglich zu sterilisieren, indem ich zuerst mit Seife, dann in 0,1 % Sublimat und schliesslich in sterilisiertem Wasser wusch, das innerhalb des Arbeitsraumes in eine ebenfalls sterilisierte Krystallisierschale gegossen wurde. Dies Vorgehen ist zwar etwas umständlich, aber Versuche mit einfacherem Verfahren erwiesen sich als unbrauchbar. Viele von den Experimenten wurden durch zufällige Infizierung verdorben, doch blieben einige von derselben verschont.

Die Experimente wurden ausgeführt 1) mit Bakterienmischungen nebst Pilzsporen, 2) mit Bakterienmischungen allein und 3) mit Reinkulturen von *Bakterium megaterium*. Wurde eine Mischung von Bakterien und Pilzsporen von *Penicillium* oder *Mucor* oben auf die Membran gebracht, so drangen die Pilze sehr rasch durch die Membran und zeigten sich nach ca. 45 Stunden in Form von kleinen Pinseln in der Gelatine. Eine mikroskopische Untersuchung dieser letzteren ergab nur Pilzhyphen, so dass die Bakterien augenscheinlich nicht mit den Pilzen zusammen durch die Membran hindurch gegangen waren. Wurden Bakterienmischungen allein verwendet, so wichen die Resultate sehr von einander ab. Doch kam niemals ein so rasches Durchdringen der Membran vor, wie es bei den Pilzen stattfand. Nach Verlauf von ca. 10—14 Tagen liess sich oft beobachten, dass eine Bakterien-Kolonie sich an einer Stelle der Gelatine ansetzte, wo diese die Membran berührte. Die Kolonie dehnte sich in die Gelatine hinein aus, und verflüssigte diese allmählich. Meistens zeigte sich nur eine Kolonie. Bei Untersuchung der Membranen stellte sich heraus, dass sich die Zellen leicht von einander lösten, und

dass Bakterien in den Zellen nicht nachgewiesen werden konnten. Wären die Kolonien an vielen Stellen auf der Membran erschienen, so hätte man daraus auf die Fähigkeit der Bakterien schliessen dürfen, wie die Fadenpilze durch Membranen zu dringen. Da aber die Kolonien meistens vereinzelt auftraten und es den Anschein hatte, als ob die Membran ein wenig verfault wäre, gelangte ich zu der Annahme, dass dieselbe nicht in derselben Weise wie von Fadenpilzen, sondern durch Massenentwicklung durchbohrt worden war, welche die Kolonie in stand setzte, jene Lücken in der Membran zu benutzen, die entweder durch die zerstörende Einwirkung der verwendeten Bakterien geschaffen oder bereits vor Beginn der Experimente vorhanden waren. Sobald Reinkulturen von *Bakterium megaterium* benutzt wurden, stellten sich ähnliche Resultate heraus. So erschien z. B. bei dem einen von zwei zu gleicher Zeit angesetzten Experimenten eine Kolonie am neunten Tage in der Gelatine, bei dem anderen am dreizehnten Tage. Die von Bakterien zu passierenden Membranen waren kutikularisiert. So lückenhaft die Versuche auch sind, so können sie dennoch zeigen, dass Bakterien nicht die Fähigkeit besitzen, in derselben Weise wie Fadenpilze leicht kutikularisierte Membranen zu durchdringen, auch selbst dann nicht, wenn ein starker chemischer Reiz sie zum Passieren der Membran anreizt.

Experimente mit Cellulose auflösenden Bakterien.

Wegen der negativen Resultate der Experimente mit Bakteriengemischen und mit Reinkulturen, beschloss ich Zellen der Einwirkung von Cellulose auflösenden Bakterien auszusetzen, um zu sehen, ob diese letzteren im stande seien, vermittelt Durchbohrung von Zellwänden in das Innere von Zellen einzudringen. Derartige Bakterien sind weit ¹⁾ verbreitet. Sie kommen in Schlamm, Kot, Dünger etc. dem Verdauungstraktus der pflanzenfressenden Tiere und überall da vor, wo pflanzliche Gewebe verfaulen. Omelianski ²⁾ hat

¹⁾ Siehe Flügge. Mikroorganismen Aufl. III, Bd. I. 1896, p. 243.

²⁾ Omelianski, Ref. Chem. Centralbl. Bd. I. 1898, p. 269.

zwei Arten von Cellulose auflösenden Bakterien unterschieden und die Bedingungen nachgewiesen, unter denen die Gärung von Baumwolle, Filtrierpapier etc. vor sich geht.

Zum Zwecke meiner Experimente wurde eine Kulturflüssigkeit bereitet, ähnlich wie Omelianski sie empfiehlt. Ihre Zusammensetzung war folgendermassen: destilliertes Wasser 100 gr, Pepton 0,1 gr, Kaliumphosphat 0,1 gr, Kaliumnitrat 0,1 gr, Magnesiumsulphat 0,1 gr. Flaschen von 400 cm³ Inhalt wurden mit der Kulturflüssigkeit nahezu angefüllt. Als Verschluss kamen Baumwollpfropfen in Anwendung. Die Kulturflüssigkeit wurde mittelst einer geringen Menge Schlamm infiziert, der von einem Teiche herrührte, in dem pflanzliche Überreste verfaulten. Auf 100 gr wurde sodann dem Inhalt einer jeden Flasche 1 gr in Streifen geschnittenen schwedischen Filtrierpapiere zugefügt. Die Flaschen kamen darauf bei einer Temperatur von 35° C. in den Wärmeraum.

Nach wenigen Wochen begann das Filtrierpapier gelbe Flecken aufzuweisen, es zeigte sich von den Bakterien angegriffen. Die Bakterien hatten sich an den Fasern angesetzt, verbreiteten sich längs derselben, sodass die Faserwände allmählich nach erfolgter Anschwellung unter Zurücklassung einer schleimigen Masse verschwanden. In dieser letzteren fanden sich die Bakterien eingebettet. Sowie lebhafte Gärung im Gange war, wurden mittelst heissen Wassers abgetötete und passende Stückchen zerschnittener Spirogyra-Fäden in kleine Glasröhren gethan, und diese mit Hülfe von Bindfaden in die Kulturflüssigkeit hinuntergelassen. Nach Verlauf von ca. 10 Tagen stellte es sich heraus, dass die Bakterien ihren Angriff gegen einige der Spirogyrazellen begonnen hatten. Die Fäden waren stellenweise angegriffen, und im selben Masse, wie sich die Bakterien, die sich an die Cellulose angeheftet hatten, vermehrten, breiteten sich die Flecken der in Gärung begriffenen Cellulose allmählich an der Oberfläche aus. Nach dem Aussehen und der Entwicklung der Flecken schien es, als ob jeder für sich ursprünglich von einem gesonderten Bakterium herrührte, das sich an irgend einem Teile des Fadens niedergelassen und dann vermehrt

hatte. Wo eine Kolonie dieser Cellulose lösenden Bakterien am Werke war, verloren die Wandungen bald ihr hohes Lichtbrechungsvermögen, schwoilen an und verschwanden schliesslich. So legten die Bakterien Bresche in die Wände der *Spirogyra*-Zellen. In einigen Fällen konnte ich beobachten, dass andere Arten beweglicher Bakterien durch die Lücken eindringen, und diese waren zwischen dem kontrahierten Zellinhalt und dem noch nicht zerstörten Teile der Zellwandungen deutlich zu erkennen. Hiebei bahnten also die Cellulose lösenden Bakterien anderen Bakterienarten den Weg zum direkten Angriff auf den Zellinhalt.

Die Blosslegung des Zellinhaltes durch die Einwirkung von Cellulose auflösenden Bakterien scheint kein ungewöhnlicher Vorgang zu sein und bildet wahrscheinlich ganz allgemein in der Natur einen wichtigen Schritt bei der Zerstörung von Zellen mit Cellulosewänden. Ich habe das Blosslegen des Inhaltes von Zellen durch Zerstörung ihrer Wandungen zu verschiedenen Malen beobachtet und greife daraus drei Beispiele heraus.

Etwas *Spirogyra* wurde in das Laboratorium gebracht und in ein gewöhnliches gläsernes Entwicklungsgefäss gethan, das mit Leitungswasser gefüllt und dessen Boden mit Schlamm bedeckt war. Die Algen starben ab. Ich überwachte die Zersetzung der Fäden und bemerkte, dass die Cellulose sehr stark anschwoil und allmählich verschwand, worauf der Inhalt der Zellen als oblonge Körper auf den Boden des Gefässes fiel.

Einige Erbsen wurden einzeln in Reagenzgläschen gethan und mit Wasser übergossen. Nachdem die Bakterien, die sich in der Flüssigkeit zeigten, einige Tage eingewirkt hatten, lösten sich infolge Zerstörung der mittleren Lamellen alle Zellen der Cotyledonen von einander. Dann wurden die Cellulose-Wandungen der isolierten Zellen immer dünner, bis sie schliesslich verschwanden und den Inhalt der Zellen gänzlich freigelegt ¹⁾ zurückliessen.

¹⁾ G. Krabbe hat ähnliche Beobachtungen gemacht, bezüglich der Verwesung des Samens von *Phaseolus multiflorus*. Untersuchungen über das Diastaseferment etc. Jahrb. für wiss. Bot. Bd. 21. 1890, p. 598.

Ich unterwarf die Blätter von *Doronicum Pardalianches* ähnlichen Bedingungen, wie die bereits behufs Erlangung der Gärung von Filtrierpapier beschrieben sind. Nach ca. einwöchentlicher Einwirkung der Bakterien zeigte es sich, dass der Inhalt der Mesophyllzellen unter Beibehaltung seiner grünen Chlorophyllkörperchen von seinen Cellulose-Wandungen befreit und auf den Boden der Kulturflüssigkeit gefallen war. Obgleich oftmals zum Teil zerbrochen und zersetzt, war er doch nach Wochen noch zu erkennen.

In all den oben angeführten Fällen waren zweifellos verschiedene Bakterien in der die verfaulenden Zellen umgebenden Flüssigkeit vorhanden. Die Zerstörung der Cellulose-Wandungen rührte aber von einem Enzym her, das von einer oder einigen wenigen der anwesenden Arten erzeugt wurde. Es ist augenscheinlich, dass jede Art, die Zellwandungen zerstört, für die dazu ungeeigneten saprophytischen Bakterien von Nutzen ist, indem sie es den letzteren ermöglicht, in direkte Berührung mit ihrem Nährstoffe zu gelangen. Die Zerstörung der Zellwände muss auch den Inhalt der Zellen für die unbehinderte Einwirkung aller der Enzyme erschliessen, die von den der verfallenden Zelle benachbarten Bakterien erzeugt werden und so das Verschwinden der Zellen beträchtlich beschleunigen. Wir sehen darin ein Beispiel für die Arbeitsteilung bei dem Prozesse der Verwesung.

Es ist wahrscheinlich, dass Protozoen, die gewöhnlich dort in grosser Zahl zu finden sind, wo Verwesung vor sich geht, oftmals aus der Thätigkeit der Cellulose auflösenden Bakterien Nutzen ziehen. Verhältnismässig wenige Protozoen sind im stande, in Zellen einzudringen, die mit Cellulose-Wandungen umgeben sind. Sobald aber die Cellulose aufgelöst ist, sind die Proteinmassen, welche den grösseren Teil des Zellinhaltes ausmachen, auf einmal all den kleinen Tieren, die von Pflanzenresten leben, vor allem aber den Protozoen, als Nahrung zugänglich. Einen Monat nach dem Beginn der Experimente mit *Doronicum*-Blättern untersuchte ich den isolierten Zellinhalt und fand ihn in Stücke zerfallen und in allen Stadien der Zersetzung. Eine Art von

Protozoen mit netzförmigen Pseudopodien und subterminaler Mundöffnung, der Form nach im allgemeinen wie eine Gromia, liess sich in bedeutender Anzahl unter diesen Zersetzungsprodukten gewahren. Die Protozoen nährten sich auf dem zerfallenen Inhalt der Zellen und viele von ihnen waren voll von Chlorophyll-Körperchen. Hier hatten also die Protozoen aus der Thätigkeit der Cellulose auflösenden Bakterien Nutzen gezogen, denn diese letzteren hatten ihnen die Nahrung zugänglich gemacht, zu der sie sonst nicht gekommen wären. Dies ist aber ein specieller Fall aus den Vorgängen, die sich aller Wahrscheinlichkeit nach ganz allgemein unter natürlichen Bedingungen vollziehen.

Des ferneren bemerkte ich bei dem oben angeführten Beispiele, dass ein abgestorbenes Protozoon sich oftmals ziemlich stark mit beweglichen Bakterien anfüllte, die im stande gewesen waren, durch die Mundöffnungen hindurch das skelettartige Netzwerk zu passieren. Die Bakterien nährten sich ohne Zweifel von den toten Protozoen. Der umgekehrte Prozess¹⁾ — dass sich lebende Protozoen von Bakterien nährten, ist oft beobachtet worden. Gewisse Arten von Protozoen²⁾ scheinen beinahe gänzlich von Bakterien zu leben. Es dürfte wohl nicht unwahrscheinlich sein, dass die endliche Zerstörung der toten Organismen zu einem grossen Teile auf die wechselseitige Verdauung toter Protozoen von Bakterien und toter Bakterien von Protozoen zurückzuführen ist.

Bei den Experimenten mit den Spirogyra-Fäden war es mir unmöglich zu bestimmen, ob die Cellulose auflösenden Bakterien in die Zellen eindringen. Jedenfalls ist es sicher, dass für sie nicht, wie bei den saprophytischen Pilzen das Durchdringen der Zellwandung lediglich ein notwendiger Schritt zur Erreichung des Zellinhaltes ist. Pilze bohren kein grösseres Loch, als sie gerade brauchen, um in die Zelle .

1) A. Fischer, Vorlesungen über Bakterien. 1897, p. 130.

2) Butschli. Dr. H. G. Bronns Klassen und Ordnungen des Tierreiches. Band. I. Protozoa. 1889, p. 868; Lister, On Chondrioderma difforme and other Mycetozoa. Annalso. Bot. 1890, p. 292.

hinein zu gelangen. Die in Frage kommenden Bakterien verbreiteten sich jedoch beständig über das Angriffsfeld auf der Cellulosefläche, bis schliesslich die ganze Substanz verschwunden war. Die geeignetsten Lebensbedingungen schienen sich ihnen nicht im Zellinneren, sondern innerhalb der Zellwände zu bieten. Offenbar ist die Zersetzung der Cellulose durchaus nicht nur ein Mittel, um zu dem Zellinhalte zu gelangen. Das lehrt die Auflösung der Filtrierpapierfasern, deren Zellen so gut wie keinen Inhalt haben. Daher kann hier ein dirigierender chemischer Reiz aus dem Zellinhalte heraus nicht in Frage kommen. Es mag noch erwähnt werden, dass alle Teile der Fasern in Angriff genommen wurden.

Betreffs der Beziehungen zwischen Cellulose auflösenden Bakterien und Zellen gelangte ich zu dem allgemeinen Schluss, dass die Bakterien nicht wie die Pilze auf einen dirigierenden chemischen Reiz aus dem Inneren der Zelle hin die Zellwandungen durchdringen, sondern dass sie Cellulosewände nur wegen der Cellulose angreifen, die ihnen als Nahrung dient.

Allgemeine Betrachtungen.

Bei einer allgemeinen Erörterung der Frage des Eindringens von Bakterien in Zellen können wir mit der Erwägung beginnen, ob diese Mikroorganismen lediglich auf mechanischem Wege (ohne jede Lösungswirkung) in geschlossene Zellen einzudringen im stande sind. Miyoshi¹⁾ hat gezeigt, dass gewisse Pilze Membranen, z. B. Blattgold, mechanisch vermittelt Adhäsion und Wachstum zu durchbohren vermögen. Die Bakterien besitzen zwei Mittel zu mechanischer Bewegung; diese geschieht nämlich 1) für bewegliche Bakterien durch Cilien, 2) durch Wachstum.

Mit Hülfe der Eigenbewegung sind Bakterien fähig, einen gewissen Druck auf feste Körper auszuüben. Wenn eine Membran aus genügend weichem Stoffe bestünde, so könnte man annehmen, dass die Bakterien auf einen dirigierenden

¹⁾ Miyoshi, loc. cit. p. 282.

chemischen Reiz hin sie durchdringen würden. Cellulose hingegen ist eine harte Substanz. Selbst Pilze durchbohren Cellulose-Membranen nicht auf rein mechanische Weise, sondern ergänzen den mechanischen Vorgang des Wachstums durch die Erzeugung eines Cellulose-Enzyms. Indem ich Nährgelatine mit einem Bakteriengemisch infizierte, fand ich, dass eine Gelatine mit 1,0 und 0,6 % genügend fest ist, um die Ausbreitung der beweglichen Formen zu verhindern, wohingegen die Kolonien bei Verwendung einer 0,4 % Gelatine nicht lokalisiert blieben. Der von ein- und selbst von zehnprozentiger Gelatine geleistete Widerstand ist aber viel geringer, als der einer Cellulosewand. Auf Grund dieser Erfahrungen dürfen wir daher den Schluss ziehen, dass bewegliche Bakterien nicht im stande sind, mit Hülfe ihrer eigenen Bewegungsthätigkeit gewöhnliche Cellulosewände zu durchdringen. Die treibende Kraft ist schwächer als der geleistete Widerstand.

Der Bau der beweglichen Bakterien ist derart, dass diese Organismen nicht im geringsten dazu eingerichtet sind, bohrend durch Membranen hindurchzugehen. Die Cilien werden behufs freier Bewegung in flüssigen Medien entwickelt. Ihre Arbeit besteht zumeist¹⁾ in einem Vorwärtsziehen und nicht im Vorwärtstossen; daher sind sie als treibende Kraft beim Bohren schlecht am Platze. Bakterien, die durch ihre Cilien so vorwärts bewegt werden, dass sie mit einer Zellwand in Berührung kommen, sind also wenig geeignet, die Cellulosewand zu passieren.

Wie schon erwähnt, habe ich beobachtet, wie sich Spirillen rasch gegen eine Spirogyra-Zelle hinbewegten, sie berührten und von dem schleimigen Überzug der Algen festgehalten wurden. Der ganze Körper eines Spirillum drang nicht in die Wand ein. Nur ein Ende wurde festgehalten und über diesem drehte sich der ganze Mikroorganismus herum, zweifellos mit Hülfe derjenigen Cilien, die noch frei geblieben waren. Ich habe nicht bemerkt, dass je ein solches Spirillum tiefer in

¹⁾ A. Fischer, Vorlesungen über Bakterien. 1897, p. 16.

die Zellwand eingebettet wurde oder andererseits, wenn es einmal fest sass, sich selbst frei gemacht hätte. Die Beschränkung der Cilien in ihrem Leistungsvermögen ist hier klar.

Aus den oben angeführten Gründen können wir schliessen, dass bewegliche Bakterien nicht im stande sind, mittelst der von Cilien verliehenen mechanischen Kraft sich durch Zellmembrane hindurch zu bohren.

Um die Zuwachsbewegung zum Durchbohren einer Membran zu verwerten, ist eine Widerlage notwendig. Bei den Fadenpilzen wird eine solche durch Ausbildung besonderer Haftorgane oder durch ein allgemeines Anklammern der Pilze an die Oberfläche der zu durchbohrenden Zellwand erreicht. Eine solche Fixierung führt dagegen ein einzelnes Bakterium nicht aus. Auch für lose oder fester verbundene Bakterienketten sind keine brauchbaren Befestigungseinrichtungen bekannt.

Die Unzulänglichkeit der mechanischen Mittel allein, Bakterien das Durchbohren von Zellwänden zu ermöglichen, macht, wie bei den Pilzen, eine gleichzeitige chemische Wirkung nötig. Der Widerstand der Zellwandungen muss durch Auflösung der Cellulose verringert werden, wie es in der That bei den Pilzen geschieht. Dann können die Bakterien mechanisch durch Wachstum oder durch Verwendung von Cilien in die Zellen hineinkommen. Man darf daher nicht erwarten, dass Bakterien, die nicht im stande sind, ein Cellulose auflösendes Enzym zu erzeugen, Cellulose-Wandungen zu durchdringen vermögen. Wenn in den bereits beschriebenen Experimenten saprophytische Bakterien nicht in das Innere intakter Zellen gelangten, so war wohl daran zum Teil der Umstand schuld, dass die betreffenden Bakterien die erforderlichen Enzyme nicht erzeugten.

Wie Bakterien fähig sind, ihre mechanischen und chemischen Kräfte zu gebrauchen, wenn sie von Zelle zu Zelle gehen, scheint vorläufig bis zu einem gewissen Grade nur bei den Leguminosen-Bakterien klar zu sein, bei denen infolge der Bildung von Infektionsfäden ein Weg gebahnt wird.

Ob Bakterien durch Zellwände hindurchzuwachsen vermögen, entweder als Einzelwesen oder als Glieder einer Kette in ungefähr ähnlicher Weise, wie es sich bei den Fadenpilzen ¹⁾ findet, ist noch nicht festgestellt.

Die vereinigte Arbeit einer Kolonie kann aber wohl die zur Auflösung der Zellwand erforderliche chemische Wirkung hervorbringen. Das durch eine grosse Zahl auf einen engen Raum beschränkter Bakterien erzeugte Cellulose - Enzym vermag die Zellwand energisch zu zerstören. Infolge ununterbrochenen Wachstums in engen Kanälen, Zellen, Inter-cellulärräume etc. muss sich eine Bakterienkolonie gezwungen sehen, sich wegen des gegenseitigen Druckes der einzelnen Bakterien vorwärts zu bewegen. Dies muss das Eindringen in Zellen begünstigen, sobald dasselbe durch die chemische Zerstörung einer Zellwand ermöglicht ist. Derartige Massenwirkung ist wahrscheinlich ein bedeutender Faktor beim Fortschreiten von Krankheiten der höheren Pflanzen.

Der wohlbekannte Fall von *Bacillus radicola*, welcher in die Wurzeln der Leguminosen eindringt, scheint ein Beispiel von Massenwirkung beim Übergange von Zelle zu Zelle zu liefern. Nach Frank ²⁾ und Prazmowski ³⁾ dringen die Bakterien durch Anwachsen einer Kolonie, der sogenannten Infektionsfäden in die Rinde der jungen Wurzeln ein. Ob nun solche Fäden lediglich aus Bakterienkolonien oder, wie Frank annimmt, aus einer Verbindung der Pilze und des Zellprotoplasmas bestehen, müssen wir als noch unentschieden dahingestellt sein lassen. Jedenfalls scheint es nach den Be-

¹⁾ Russel, (loc. cit. p. 234) fand bei seinen Impfexperimenten, dass Bakterien in unverletzte Zellen eingedrungen waren und bestimmt im Inneren der Zellen nachgewiesen werden konnten. Er vermochte nicht irgend welche Öffnungen in der Zellwand zu finden und nimmt an, dass die Bakterien die Eigenschaft besitzen, mittelst erzeugter Enzyme ihren Weg von Zelle zu Zelle zu nehmen, ohne eine bleibende Öffnung zu machen, so wie es bei gewissen Ustilagineen der Fall ist.

²⁾ Frank, Über die Pilzsymbiose der Leguminosae. Landw. Jahrb. 1890, p. 530.

³⁾ Prazmowski, Die Wurzelknölchen der Erbse. Versuchsstats. 1890, p. 211.

obachtungen Prazmowskis (loc. cit.), dass das Eindringen der Fäden durch Zellwände infolge der chemischen Auflösung der Cellulose und durch die mechanischen Bewegungen beim Wachstum ermöglicht wird. Soweit bekannt, kommen nur beim *Bacillus radicola* Infektionsfäden vor. Die Bildung solcher Fäden, wie sie auch gestaltet sein mögen, scheint eine besondere Anpassung der in Frage kommenden symbiotischen Organismen zu sein, denn mit ihrer Hilfe vermögen die Bakterien rasch die für ihre Entwicklung geeignetsten Gewebe zu erreichen. Die Fäden werden dabei im allgemeinen ähnlich wie Pilzfäden die Wandungen durchbohren. Ob dabei das Cellulose-Enzym von den Bakterien oder durch das Zellprotoplasma erzeugt wird, muss gegenwärtig noch unentschieden bleiben. Es hat sich gezeigt, dass bewegliche Formen von *Bacillus radicola* durch den chemischen Reiz von Zucker¹⁾ angelockt werden. Das Eindringen der Bakterienfäden in die Rinde von Wurzeln ist nach seiner auffallenden Ähnlichkeit mit dem Hindurchgehen der Pilze von Zelle zu Zelle wahrscheinlich auch von einem dirigierenden chemischen Reize begünstigt. Die Durchbohrung der Zellwände während des Eintretens der Fäden in die Rinde ist augenscheinlich nur ein Schritt auf dem Wege zur Erreichung des Zellinhaltes und nicht begleitet von der allgemeinen Zerstörung der Cellulose jener Zellen, durch welche die Fäden hindurchgehen. Dies wiederum ist ganz ähnlich der Art und Weise, wie Pilz-Hyphen von Zelle zu Zelle gehen, die bekanntlich, nachdem die Durchbohrung der Zellwand vollzogen ist, die entstandene Öffnung nicht vergrößern. Die Bedeutung, welche die Auflösung der Zellwand bei den Leguminosen-Bakterien hat, ist wesentlich verschieden von derjenigen bei den Bakterien des Verwesungsprozesses. Im ersteren Falle wird Cellulose lokal gelöst, um einen Weg in das Innere der Zelle zu bahnen. Im letzteren Falle werden die Cellulose-Wandungen angegriffen behufs Erlangung der Cellulose als Nahrung.

Gerade die Vorgänge während des Hindurchgehens der

¹⁾ Mazé, Les Microbes des Nodosities les Leguminenses. Ann. de l'institut Pasteur. 1898, p. 22.

Bakterien von Zelle zu Zelle oder von intercellulären Räumen in Zellen im Verlaufe von bakteriellen Krankheiten bei Pflanzen harren noch der genauen Untersuchung.

Die Arbeiten von Kienitz-Gerloff¹⁾ und anderen haben gezeigt, dass die Verbindung von Zellen untereinander in dem Gewebe der höheren Pflanzen vermittelt Protoplasma-Fäden, die durch feine Öffnungen in den Zellwänden hindurchführen, eine sehr gewöhnliche Erscheinung ist. Der oben genannte Beobachter kam nach ausgedehnten Forschungen zu dem Resultate²⁾, dass alle lebenden Zellen, die sich am Aufbau irgend einer der höheren Pflanzen beteiligen, in dieser Weise mit einander verbunden sind. Daher entsteht die Frage, ob die Pflanzenkrankheiten erregenden Bakterien bei ihrem Wege von Zelle zu Zelle diese Kanälchen, durch welche die Plasmaverbindungen hindurch treten, benutzen können.

Russel³⁾ hat diese Annahme bereits erörtert und bezüglich der Kanälchen die Ansicht aufgestellt, dass diese durchschnittlich so klein sind, dass es als kaum möglich erscheint, dass sie zum Zwecke des Vordringens von Zelle zu Zelle durch die Bakterien benutzt werden.

Nach Kienitz-Gerloff⁴⁾ beträgt die Stärke der Plasmaverbindungen zwischen den Zellen für Phanerogamen „zwischen 0,5 μ und höchstens 1,0 μ .“ Bei den folgenden Bakterien, die in den höheren Pflanzen Krankheiten erregen, sind die Dimensionen: *Pseudomonas campestris* (P.)⁵⁾, erzeugt bei den Cruciferen eine Braunfäule 0,7 — 3,0 \times 0,4 — 0,5 μ ; *Bacterium solanacearum*⁶⁾ erzeugt eine Krankheit in

¹⁾ Kienitz-Gerloff. Die Protoplasmaverbindungen zwischen benachbarten Gewebelementen in der Pflanze. Bot. Zeit. 1891, p. 17.

²⁾ loc. cit. p. 22.

³⁾ Russel, Bacteria in their relations to vegetable tissue. Johns Hopkins Hospital Reports. Vol. III. 1893, p. 236. Ein Vergleich der Grössenverhältnisse ist nicht gegeben.

⁴⁾ loc. cit. p. 33.

⁵⁾ E. Smith, *Pseudomonas campestris* (P.) The cause of a brown rot in cruciferous plants. Centralblatt f. Bakt. Bd. III. 1894, p. 278.

⁶⁾ E. Smith, A bacterial disease of the tomato, eggplant and Irish potato. U. S. Dep. of Agriculture. Div. of vegetable physiology and pathology. Bulletin no. 12, p. 10.

verschiedenen Arten der Solanaceen $1,5 \times 0,5 \mu$; Bacillus¹⁾ tracheiphillus, erzeugt das Abwelken von einigen Cucurbitaceen $1,2 - 2,5 \times 0,5 - 0,8 \mu$; Kramers²⁾ Kartoffel-Fäule-Bacterium $2,5 - 4,0 \times 0,7 - 0,8 \mu$, Bacterium Hyacinthi³⁾ $2,5 \mu$ lang und zwei bis viermal so lang als breit; der Bacillus⁴⁾, der eine Bakterienkrankheit von Futterrüben erzeugt, $1,3 - 2,0 \times 0,7 - 1,0 \mu$. Bei der Betrachtung dieser Zahlen bin ich geneigt, Russels Ansicht beizustimmen. Doch scheint mir noch die Frage offen zu bleiben, ob nicht einige der kleineren Bakterien doch ab und zu einige der grösseren Kanälchen benutzen, um von einer Zelle in eine andere zu gelangen. Dies wäre insofern möglich, als die Durchmesser von einzelnen der Bakterien $0,4 - 0,5 \mu$ betragen, während der Durchmesser der Plasmafäden bisweilen $1,0 \mu$ erreicht. Im allgemeinen aber dürfte die direkte Benutzung der Kanälchen seitens der Bakterien auf ihrem Wege von Zelle zu Zelle als ausgeschlossen erscheinen. Faktoren bei der Durchdringung von Zellwänden durch Bakterien sind möglicherweise die Erweiterung der Kanälchen oder die Zersetzung der dünnen Membran zwischen gegenüberstehenden Tüpfeln durch ein Enzym. Sicherlich muss da, wo solche Kanälchen und Tüpfeln vorkommen, eine Wand am schwächsten und infolgedessen am leichtesten zu zerstören sein.

Die Annahme, dass die Kanälchen der Plasmaverbindungen von pathogenen Bakterien in der Regel nicht benutzt werden, wird durch die Thatsache unterstützt, dass bei den meisten Krankheitserscheinungen die Zellwände zertrümmert und zerstört werden, z. B. bei den Krankheiten der Olive, der Kartoffel, der Cruciferen etc. Erwin Smith hat bewiesen, dass

1) E. Smith, Bac. trach. sp. nov. die Ursache des Verwelkens verschiedener Cucurbitaceen. Centralbl. f. Bakt. 1895, p. 367.

2) E. Kramer, Siehe E. Smith. The bacterial diseases of plants: a critical review etc. The American Naturalist 1897, p. 131.

3) T. H. Wakker, Contributions a la pathologie végétale. Archives néerlandaises d. Sci. ex. et nat. Tome XXIII. 1839, p. 10.

4) E. Kramer, Siehe E. Smith. The bact. diseases of plants: a critical review etc. The American Naturalist 1896, p. 720.

bei der von *Pseudomonas campestris* erregten Krankheit des Kohls (loc. cit.) die Infizierung dadurch entsteht, dass die Bakterien in die Wassertropfen hineingelangen, die an den Wasserporen der Blätter ausgeschieden werden. Dann dringen die Bakterien zunächst in die intercellulären Räume und darauf in die Zellen. Es ist vollkommen klar, dass die Kanälchen der Plasmaverbindungen im Anfange nicht benutzt werden, denn die Wände der intercellulären Räume bestehen aus fester Cellulose. Nur durch Lösung der Cellulose vermögen die Bakterien in die Zellen hineinzugelangen. Daher ist das Vorhandensein von winzigen Kanälchen für das Passieren der Bakterien von Zelle zu Zelle nicht notwendig.

Bei der Beobachtung der Verwesung von Blättern von *Doronicum Pardalianches*, die Bedingungen unterworfen wurden, wie sie für die Gärung der Cellulose geeignet sind, fand es sich, dass die langen vielzelligen durch Cuticula geschützten Haare wochenlang ihre Cellulose erhielten, nachdem diese bereits von den anderen Blattteilen verschwunden war. Ich bemerkte, dass die Zellen an der Basis der Haare gewöhnlich sich ziemlich stark mit mittelgrossen beweglichen ovalen Bakterien anfüllten, deren freies Hineingelangen in die Zellen infolge der Zerstörung der unteren uncuticularisierten Cellulose-Querwand ermöglicht wurde. In den Querwänden eines jeden Haares entstanden tiefe Tüpfel. Ohne Zweifel existierte eine Verbindung¹⁾ der Zellen untereinander durch Poren. Die Haare wurden während einiger Tage beobachtet, aber die Bakterien drangen nicht in die nächsten Zellen ein. Wären die Bakterien im stande gewesen, die Kanälchen der Plasmaverbindung zu benutzen, so scheint es mir höchst wahrscheinlich, dass sie es dann auch gethan hätten. Ich kam deshalb zu dem Schlusse, dass die Poren zu klein seien, um derartig benutzt zu werden. Eine ähnliche Auffassung wird durch die Thatsache nahegelegt, dass bei meinen Experimenten mit

¹⁾ Kienitz-Gerloff, (loc. cit. p. 20) erwähnt das Vorkommen von Poren zwischen den Zellen von Haaren als definitiv erwiesen und giebt zwei Figuren.

Blättern von Moosen und Hymenophyllum die Bakterien nicht aus einer Zelle in die andere kamen.

Es ist noch nicht aufgeklärt, in wie weit Reize beim Dirigieren der chemischen und mechanischen Energien von pathogenen Bakterien mitspielen, wenn diese durch pflanzliche Gewebe hindurchgehen. Dass es ein dirigierender chemischer Reiz ist, der Bakterien veranlasst, durch zerstörte Zellwände hindurch vermittelst Entwicklung von Kolonien oder mit Hülfe von Cilien von Zelle zu Zelle zu dringen, dürfte sich aus der Thatsache ergeben, dass Mikroorganismen gewöhnlich sehr empfindlich für dirigierende chemische Reize sind. Es ist möglich, dass die Erzeugung von Cellulose-Enzym durch die Nährungsstoffe in den Zellen, möglicherweise durch Berührung der Organismen mit den Cellulose-Membranen, reguliert wird. Marshall Ward ¹⁾ jedoch fand, dass eine Botrytis-Art, die eine Lilienkrankheit erregt, in Pasteur'scher Lösung ganz ohne Rücksicht auf das Vorhandensein von Cellulose ein Cellulose-Enzym erzeugte. Er wies nach, dass das Enzym in Tropfen an dem Ende der Hyphen ausgeschieden ward, ²⁾ besonders wenn das Wachstum der letzteren aufhörte. Wenn solche Tropfen ausgeschieden wurden, ³⁾ beobachtete er, dass das Zusetzen von einem wenig frischer Nährlösung genügte, um eine weitere Ausscheidung zu verhindern. Obgleich dies kein Beweis ist, legen es diese Thatsachen doch nahe, dass diese Botrytis-Art fähig ist, die Erzeugung von Cellulose-Enzym, entsprechend dem vorhandenen Bedarfe zu regulieren. Zur Unterstützung dieser Annahme mag hier erwähnt werden, dass Katz ⁴⁾ nachgewiesen hat, dass Pilze und Bakterien die Produktion von Diastase nach Bedarf regulieren. Die Rolle, welche eventuell der chemische Reiz des Zellinhaltes bei der Dirigierung

¹⁾ Marshall Ward, On a lily-disease. Annals of Bot. Vol. II. 1888, p. 346—351.

²⁾ loc. cit. p. 340.

³⁾ loc. cit. p. 340.

⁴⁾ Katz, Die regulatorische Bildung von Diastase durch Pilze. Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. 31. 1898, p. 601.

der die Zerstörung der Cellulose vollführenden Bakterien spielt, ist bisher noch unbekannt.

Die Beziehung zwischen Pilzen und Bakterien, bezüglich des Eindringens in Zellen.

Die saprophytischen Pilze schliessen eine grosse Zahl von Arten ein, die eine sehr weite Verbreitung haben. Obgleich sehr verschieden in ihren Fortpflanzungsorganen, stimmen sie doch gewöhnlich in der Entwicklung vegetativer Hyphen, wie ferner in dem Vermögen dieser überein, unter günstigen Verhältnissen mit beträchtlicher Schnelligkeit in tote Zellen einzudringen. Fast alle pflanzlichen Zellen sind den Angriffen von Pilzen ausgesetzt. Wahrscheinlich verwesen nur wenige Pflanzen, die höher stehen als die Thallophyten, ohne dass nicht wenigstens in einige ihrer Zellen Pilze eintreten. Soweit nun die biologischen Beziehungen zwischen Pilzen und Bakterien in Betracht kommen, ist es deshalb von Wichtigkeit zu wissen, ob durch das Eintreten von Pilzen in Zellen auch Bakterien der Weg geöffnet wird. Infolge ihrer ausserordentlich geringen Grösse können Bakterien in sehr winzige Räume und durch ausserordentlich enge Kanäle hineinwachsen und dieselben durchdringen. Beim Eindringen in Zellen müssen die Pilze Löcher in die Zellwandungen bohren. Daher harrt die folgende Frage einer Lösung: Können Bakterien durch die Öffnungen, die Pilze bei ihrem Passieren der Zellwand verursacht haben, in Zellen eindringen? Um darauf eine Antwort zu erhalten, wurden die folgenden Experimente angestellt.

Kleine cylindrische Gefässe mit 1 cm weitem Halse wurden mit runden sehr dünnen Deckelchen aus Glimmer bedeckt, durch die mit einer Nadel zahlreiche kleine Löcher gebohrt worden waren. Die innere Epidermis einer Zwiebel-
schale von *Allium cepa* wurde abgezogen, 24 Stunden lang in Alkohol gelegt und darauf in destilliertem Wasser gewaschen. Passende Streifen wurden dann auf den Glimmer gebracht,

und die Gefässe mit einer 3% Zuckerlösung gefüllt. Die Deckelchen mit den Membranstreifen wurden alsdann auf die Öffnung der Gefässe gesetzt. Auf diese Weise trat die Zuckerlösung durch die Löcher in dem Glimmerdeckel und kam in direkte Berührung mit der unteren Fläche jedes Membranstreifens. Die oberen Flächen der Membranen wurden dann mit einer Lösung befeuchtet, die bewegliche und unbewegliche Bakterien enthielt und mit den Sporen von *Botrytis* bestreut. Darauf kamen die Gefässe in eine Feuchteammer. Nach 48 Stunden wurden die Membranen sorgfältig unter dem Mikroskop untersucht. Auf den von dem Zucker ausgehenden dirigierenden Reiz hin hatten die Pilzhypphen die Membranen durchbohrt, und viele derselben waren in die Zuckerlösung gelangt. Einige Zellen waren an verschiedenen Stellen durchbohrt worden. Jedoch konnte ich in keiner Zelle Bakterien entdecken, obgleich sich solche sehr zahlreich auf den Flächen der Membranen vorfanden. Bemerkt sei noch, dass die Zellen von beträchtlicher Grösse und geeignet für die Untersuchung waren. Ähnliche Experimente mit *Penicillium glaucum* lieferten gleiche Resultate.

Dann wurden Experimente mit den Haaren von *Heraclium flavescens* angestellt. Die Haare sind einzellig und besitzen ein sehr weites Lumen. Junge Blätter von den Knospen wurden in Alkohol abgetötet und in Wasser gewaschen. Passende mit Haaren besetzte Stückchen wurden dann auf Objektträger gelegt und mit verschiedenen Lösungen befeuchtet, die verschiedene Gemische von Bakterien enthielten. Dadurch wurden die Haare mit einer dünnen Flüssigkeitsschicht bedeckt. Nimmehr säte ich Sporen von *Botrytis* auf die Haare und brachte die Objektträger in eine Feuchteammer, um Verdunstung zu verhindern. Nach zwei Tagen stellte es sich heraus, dass die *Botrytis*-Hypphen in die Zellen eingedrungen waren. Bakterien wimmelten ausserhalb der Zellen, manche klebten an den Wänden, aber im Inneren konnte ich keine entdecken. Nach vier Tagen hatten sich die Hypphen in den Haarzellen verzweigt und vermehrt, aber Bakterien schienen in den Zellen durchaus nicht anwesend

zu sein. Bei einigen der Experimente schnitt ich absichtlich die Spitzen von einigen wenigen der Haare ab. In diesen Fällen drangen die Bakterien stets in beträchtlicher Anzahl in die Zellen ein und liessen sich hier leicht nachweisen. Auch Hyphen waren in diese Zellen gelangt und beweisen dadurch, dass Pilze und Bakterien zusammen in denselben Zellen zu leben vermögen. Aehnliche Experimente wurden dann mit Moosblättern und Farn-Prothallien vorgenommen. Obgleich diese Objekte infolge der geringeren Grösse der Zellen für die Beobachtung nicht so geeignet waren wie die Haare von *Heracleum*, so war doch das Resultat allem Anschein nach dasselbe wie vorher. Ich konnte keine Bakterien zusammen mit den Hyphen in den Zellen entdecken. Verletzte Zellen, deren Wände zertrümmert worden waren, zeigten sich oft dicht mit Bakterien angefüllt.

Die oben angeführten Experimente führen zu dem Schluss, dass das Eindringen von Pilzhypen in Zellen gewöhnlich nicht von dem gleichzeitigen Eindringen von Bakterien begleitet ist.

Die Erklärung für die erhaltenen negativen Resultate scheint auf physikalischem Gebiet zu liegen. Während ein Pilzfaden durch eine Zellwand dringt, lässt er augenscheinlich keine offenen Zwischenräume zwischen sich selbst und dem Kanal, den er in die Zellwand bohrt. Die allgemeine Art und Weise des Durchdringens von Zellwänden durch *Botrytis*-hypen und *Penicillium* ist nach Miyoshi ¹⁾ die folgende: zuerst entwickeln sich Haftorgane, die sich direkt an die zu durchbohrende Zellwand anlegen. Bei *Botrytis* sind diese Organe sehr stark ausgeprägt. Bei *Penicillium* lassen sie sich kaum von den gewöhnlichen Hyphen unterscheiden. Die anliegenden Flächen der Organe veranlassen dann die Entwicklung der eindringenden Hyphen, die direkt durch die Zellwand hindurch wachsen. Solche Hyphen sind im Durchmesser oft bedeutend kleiner als die Haftorgane. Wenn diese Organe entwickelt sind, dürften Bakterien anscheinend keine

¹⁾ Miyoshi, loc. cit. p. 278, 279.

Aussicht haben, zusammen mit den Hyphen einzudringen. Manchmal jedoch werden keine Haftorgane gebildet, und ein Pilzfaden kann dann eine Zellwand mit Hilfe seiner wachsenden Spitze durchbohren, sobald er in Berührung mit der Membran¹⁾ kommt. Im allgemeinen jedoch scheint es, dass Lösung der Zellwände und Wachstum der eindringenden Hyphen gleichzeitig und zwar genau im gleichen Verhältnis vor sich geht, so dass keine Lücke offen gelassen wird, durch welche Bakterien von aussen in die Zelle hineingelangen können.

Die Pilze sind also in Bezug auf das Eindringen den Bakterien überlegen. Dadurch spielen sie aber eine wichtige Rolle bei der Zerstörung von Zellen. Wenn diese dann durch Pilzfäden weitergehend zerstört sind, werden nunmehr auch durch die sich bildenden Risse Bakterien in das Innere gelangen und bei der weiteren Zerstörung mitwirken.

Die Einwirkung von Bakterien auf den Inhalt von Zellen durch Enzyme.

Bei einigen meiner Experimente mit Bakteriengemischen stellte es sich heraus, dass der Zellinhalt langsamen Veränderungen unterlag, die augenscheinlich von Zersetzung herrührten, obgleich Bakterien nicht in die Zellen eindrangten. Die Spirogyra- und Cladophora-Fäden enthielten, bevor sie in die Bakterienkulturen gebracht wurden, einen Überfluss an Stärke. Bei Anwendung der Jodprobe zeigte es sich, dass die Stärke zuweilen allmählich verschwand. Die in den Proteinen stattfindenden Veränderungen konnten nicht so bestimmt nachgewiesen werden. Dass aber solche vor sich gingen, war ersichtlich, denn der abgestorbene Protoplasma-inhalt verlor nach und nach seine vorherigen scharfen Ränder und seine Substanz ward zum Teil zerstört. Zuweilen gliederten sich kleine Partikel ab und zeigten Brown'sche Bewegungen.

¹⁾ Miyoshi, loc. cit. p. 279.

Da in das Innere der Zellen Bakterien nicht eingedrungen waren, so mussten dieselben durch Enzyme gewirkt haben. Das Hindurchgehen von Enzymen durch Zellwände ist jedoch in Frage gestellt worden.

Dass viele Enzyme z. B. Arten von Diastase, proteolytische und Cellulose-Enzyme wenigstens in einigen Fällen fähig sind, durch Zellwände hindurch zu dringen, erfordert keinen experimentellen Beweis. Es kann direkt aus der Thatsache ihrer Erzeugung gefolgert werden. Pilze zum Beispiel erzeugen sehr verschiedene Enzyme, aber erst nach dem Durchtritt durch die Wände der Zellen, die diese Enzyme* ausscheiden, können sie benutzt werden. Die Erzeugung von Invertin durch Hefe und von Diastase durch das Scutellum von Gramineen legt weiterhin Zeugnis dafür ab, dass Enzyme durch Zellwände diosmieren. Doch scheint es mir, dass wir kaum berechtigt sind, aus der Ausscheidung von Enzymen zu schliessen, dass alle Enzyme der Diosmose durch alle Zellmembranen fähig sind. Diese beiden Arten von Substanzen haben sehr verschiedene Zusammensetzung und eine diesbezügliche Folgerung verlangt experimentellen Nachweis.

Die Diosmose von Diastase ist von zwei Beobachtern experimentell studiert worden, die zu entgegengesetzten Resultaten gelangt sind.

Krabbe¹⁾ kam zu dem Resultate, dass Diastase aus Keimlingen extrahiert, nicht durch Zellwände hindurchzugehen vermochte ausser unter Druck. Als die Endosperme von Samen²⁾ monatelang in eine Diastase-Lösung gelegt wurden, zeigte keines von den Stärkekörnern in den geschlossenen Zellen irgendwelche Spuren von Corrosion. Krabbe³⁾ beobachtete ferner, dass wenn Samen von *Phaseolus multiflorus* in eine Lösung gebracht wurden, in der ein Gemisch von Bakterien vorhanden war, die Stärke in den Zellen in

¹⁾ Krabbe, Untersuchungen über das Diastaseferment etc. Jahrb. f. wiss. Bot., Bd. 21, 1890, p. 591.

²⁾ loc. cit. p. 597.

³⁾ loc. cit. p. 598.

diesem Falle nicht eher angegriffen wurde, als bis die Cellulosewände zerstört waren.

Gruss anderseits erhielt gerade entgegengesetzte Resultate. Er fand, dass er Diastase aus unverletzten¹⁾ Zellen extrahieren konnte, und dass umgekehrt²⁾ Diastase durch Zellwände in Zellen einzudringen vermochte. Wenn zum Beispiel Endospermzellen von Mais in Diastaselösung³⁾ gelegt wurden, so waren nach ungefähr drei Wochen fast alle Stärkekörner in den geschlossenen Zellen corrodirt. Er schloss⁴⁾ daraus: „Als Resultat dieser Untersuchungen ergibt sich unzweifelhaft, dass die Diastase durch die Zellhaut zu diffundieren vermag.“ Die positiven von Gruss erhaltenen Resultate scheinen mit Sicherheit diese Auffassung zu unterstützen.

Bei ihren Untersuchungen benutzten Krabbe und Gruss Stärke enthaltende Gewebe der höheren Pflanzen. Bei den nun zu beschreibenden Experimenten kamen Algen zur Anwendung. Es sollte der Versuch gemacht werden, nachzuweisen, ob 1) die Diastase von Phanerogamen und 2) die von Bakterien erzeugte Diastase durch Zellwände diffundieren könne. Im letzteren Falle wurden Reinkulturen von *Bacterium megaterium* verwendet. Der Vorteil beim Gebrauch von Algenfäden ist, dass jede Zelle der Flüssigkeit, in der sie sich befindet, eine grosse Oberfläche darbietet, wie auch ferner, dass der Diastase die Möglichkeit benommen ist, durch Plasmakanälchen in die Zellen hineinzugelangen. Doch sind Algenzellen für die Beobachtung der Korrosion von Stärkekörnern nicht günstig. Das Verschwinden der Stärke wurde nur mit der Jodprobe erwiesen. Zum Zwecke eines jeden Experimentes wurde eine kleine Menge der zu verwendenden Algen in kochendem Wasser erwärmt. Dadurch bildete sich in den Zellen ein Stärkekleister und bei Anwendung von Jod wurden die Zellen dunkelblau gefärbt. Wenn sich nach der Ein-

¹⁾ Gruss, Über das Verhalten des diastatischen Enzyms in der Keimpflanze: *Jahrb. f. wiss. Bot.* Bd. 26, 1894, p. 388.

²⁾ loc. cit. p. 402.

³⁾ loc. cit. p. 403.

⁴⁾ loc. cit. p. 419.

wirkung der Diastase der Zellinhalt nicht so dunkel färben liess als zuerst, so wurde daraus geschlossen, dass infolge der Einwirkung von Diastase, die durch die Zellhaut gedrungen war, eine Umwandlung der Stärke in Zucker vor sich gegangen war. Wenn sich die Zellen mit Jod nicht mehr blau färben liessen, so schloss man daraus, dass die sämtliche vorhandene Stärke entfernt worden war. Zum Vergleiche diente die Färbung von Fadenstücken, die inzwischen keiner Bakterienwirkung unterworfen gewesen waren. Die Vergleichung wurde jedesmal sowohl makro-, wie mikroskopisch vorgenommen.

Kleine Erlenmeyer'sche Flaschen wurden zu einem Viertel mit einer Lösung gefüllt, welche neben anorganischen Nährsalzen, etwas Diastase enthielt. Diese Lösung war ausserdem mit 10 % Äther versetzt und mit HCl schwach angesäuert. Cladophorafäden, die der Sonne ausgesetzt worden und reich an Stärke waren, wurden in kochendem Wasser getötet und in die Flüssigkeit hineingethan. Die Flaschen wurden mit Gummistöpseln versehen und bei einer Temperatur von 25° C. gehalten. Nach achttägiger Wirkung stellte sich bei einer Prüfung der Fäden mit Jod heraus, dass die Stärke in den Zellen abgenommen hatte. Im Verlaufe einer zweiten Woche war sie ganz verschwunden. Die Cladophorazellen in den Kontrollversuchen behielten ihre Stärke und liessen sich mit Jod stark dunkel färben. Aus dem oben angeführten Resultat geht ohne Zweifel hervor, dass die Diastase höherer Pflanzen die Wände von Algen, z. B. von Cladophora, durchdringen kann.

Dann wurden Experimente mit Reinkulturen von *Bacterium megaterium* angestellt. Zur Anwendung kam dasselbe Verfahren, wie es von Katz¹⁾ beschrieben wird. Die Lösung war von folgender Zusammensetzung:

Monokaliumphosphat	0,01 gr
Kaliumnitrat	0,01 „
Calciumnitrat	0,04 „

¹⁾ Katz, Die regulatorische Bildung von Diastase durch Pilze. Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. 31, 1898, p. 601.

Chlornatrium	0,01 gr
Magnesiumsulphat	0,02 „
Ammoniumnitrat	0,15 „
Pepton	0,50 „
Destilliertes Wasser	100,00 „

Dieser Lösung wurden 15⁰/₁₀ Lintner'scher löslicher Stärke zugesetzt. Mit Hilfe von Natriumcarbonat wurde die Flüssigkeit schwach alkalisch gemacht und nach Verteilung in die Erlenmeyer'schen Flaschen auf gewöhnliche Weise sterilisiert. Die Impfung wurde mit Reinkulturen von *Bacterium megaterium* ausgeführt und die Flaschen bei einer Temperatur von 25° C. in den Wärmeraum gebracht. Eine Untersuchung der Flüssigkeit mit Jod fünf Tage nach der Infizierung ergab, dass die lösliche Stärke verschwunden war. Es war damit bewiesen, dass *Bacterium megaterium*, mit dem ich gearbeitet, ein Diastase-Enzym zu erzeugen vermochte.

Danach wurden Experimente unternommen, bei denen die lösliche Stärke durch Spirogyrafäden ersetzt wurde, die reichliche Stärke enthielten. Im übrigen fand die Herstellung und Impfung der Lösung wie vorher statt. Die Stärke verminderte sich langsam in den Zellen, und 5 Wochen nach erfolgter Infizierung war sie verschwunden. Bei den sterilen Kontrollexperimenten war inzwischen die Jodbläuung unverändert geblieben. Somit ist nachgewiesen, dass die von *Bacterium megaterium* erzeugte Diastase durch die Wände von Spirogyrazellen diosmiert.

In gleicher Weise wurden Experimente mit einem *Thermo-Bacterium* vorgenommen. Obgleich die Bakterien sich in den Kulturen gut entwickelten, stellte es sich nach 6 Wochen heraus, dass sich weder die lösliche Stärke, noch die Stärke in den Zellen vermindert hatte. Es war also keine Diastase erzeugt worden.

Bei einigen Experimenten mit *Bacterium megaterium* wurden Spirogyrafäden und 0,15⁰/₁₀ lösliche Stärke in dieselbe Lösung gethan. In diesen Fällen verschwand die lösliche Stärke in ungefähr 4—5 Tagen und die Stärke aus den Zellen nach einer Einwirkung von ca. 5 Wochen. Das langsame Ver-

schwinden der Stärke aus den Zellen scheint darzuthun, dass die Diastase nur langsam durch Zellwände hindurchgeht.

Wurden Spirogyra- oder Cladophora-Fäden der Einwirkung eines Gemisches von Bakterien ohne Zuckerzusatz unterworfen, so verschwand die Stärke oft nach wenigen Wochen aus den Zellen. Dies zeigte sich, wenn z. B. Cladophorafäden mit reichem Stärkegehalt in eine Kulturflüssigkeit gebracht wurden, die sich für die Entwicklung von Cellulose-Gärung eignet. In Kulturen jedoch, die 10 oder nur 5% Zucker enthielten, verblieb die Stärke viele Wochen lang in den Zellen ohne Zeichen von Abnahme. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen der Arbeit von Katz (loc. cit.) überein, der gezeigt hat, dass die Produktion und Ausscheidung von Diastase bei reichlichem Zuckergehalt unterbleibt.

Die Resultate meiner Experimente, welche Diosmose der Diastase durch Zellwände ergeben, stehen in Widerspruch mit denen, die Krabbe erhielt, stimmen aber mit den Erfahrungen von Gruss überein.

Sind Enzyme im stande, durch Zellwände zu diosmiren, so ist es klar, dass der Inhalt einer Zelle, die sich in einer an Bakterien reichen Flüssigkeit befindet, nach und nach von den Enzymen angegriffen werden wird, die von diesen Bakterien erzeugt werden. Auf diesem Wege sind, wie meine Experimente erwiesen haben, Bakterien, die nicht mittelst Durchdringung der Zellmembran in Zellen hineingelangen können, dennoch im stande, zu Nahrung zu kommen. Doch kann kein Zweifel darüber herrschen, dass die Zellmembran den Zellinhalt bis zu einem gewissen Grade vor den Enzymen schützt, die in der Umgebung der Zelle sich befinden.

Das Eindringen von Bakterien durch Eischalen.

Das Verfaulen der Eier wird gewöhnlich der Einwirkung von Bakterien zugeschrieben, die durch die Eischale in das Innere des Eies eindringen. Um diese Thatsache klar zu legen und zu erweisen, in welcher Weise das Hindurchgehen

der Bakterien durch Eischalen unter bestimmten Bedingungen erfolgt, wurden die folgenden Experimente angestellt.

An dem stumpfen Ende eines jeden der benutzten Eier wurde ein kleines Loch gemacht und der Inhalt herausgeschüttelt, darauf die Innenfläche der Schale mit destilliertem Wasser gewaschen. Nun wurden Bechergläser genommen von solcher Grösse, dass die Eier in den leeren Gläsern mit der Spitze nach unten gerade aufrecht auf dem Boden ruhten. Jeder Becher wurde bis ca. zu einem Drittel seiner Höhe mit Nährgelatine gefüllt, der 0,5 % Fleischextrakt, 0,5 % Pepton und 5,0 % Zucker zugesetzt worden. Über jeden der zur Aufnahme der Eier verwendeten Becher wurde ein umgestülptes Glas gesetzt (b. in Fig. 3), das etwas Baumwolle

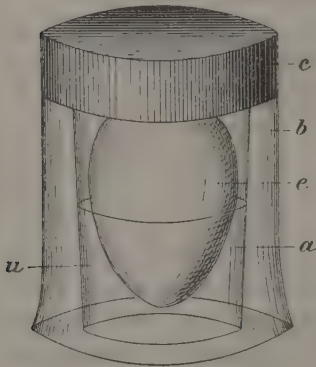


Fig. 3.

a Gelatine. b umgekehrtes Becherglas. c Baumwolle. e Eischale.
u aufrechtstehendes Becherglas.

enthielt. Legte man nun eine Eischale mit der Spitze nach unten in einen mit warmer flüssiger Gelatine gefüllten Becher, so schwamm sie auf der Flüssigkeit. Ward jedoch der zweite Becher als Verschluss über den ersten gestülpt, wie z. B. beim Beginn des Experimentes, so schloss er die Öffnung des aufrechtstehenden Glases und zwang die Eischale in die Gelatine hineinzutauchen, so dass deren untere Hälfte bedeckt und zugleich das Loch an dem jetzt oben befindlichen stumpfen Ende des Eies verstopft war. Die beiden Bechergläser waren so lang, dass sie beide, das innere mit dem Boden, und das äussere mit dem Rande auf einer Glasplatte aufsassen, wenn sie in der gegebenen Art über einander gesetzt waren. Die Sterilisierung der Becher mit der Gelatine und die der Eier fand gesondert statt. Die Eier wurden zwischen zwei Krystallisierschalen gebracht, die in einander passten, und hierin drei Tage hintereinander täglich eine Stunde mit

Dampf von 100° C. erhitzt. Die Gläser mit der Gelatine, mit den Verschlussbechern bedeckt, wurden in ähnlicher Weise sterilisiert, aber täglich nur eine kurze Zeit erhitzt. Nach erfolgter Sterilisierung wurden die Gefässe mit den Eiern und die Becher mit der Gelatine, die noch warm und flüssig war, in den Glasarbeitsraum gebracht, dessen Luft mit Dampf sterilisiert worden war. Hier wurden nun mit Hilfe von sterilisierten Pincetten die Eier mit der Spitze nach unten eins nach dem anderen in die aufrechtstehenden Gläser gesetzt. Die Verschlussgläser, die für einen Augenblick aufgehoben worden, wurden sofort wieder in die schon angegebene Stellung gebracht. Nachdem sich die Gelatine durch Abkühlung verfestigt hatte, wurde der Glasarbeitsraum nochmals ausgedampft. Der Reihe nach wurden dann die Verschlussbecher ein weiteres Mal entfernt und mit wenigen Tropfen Wasser vorsichtig ein Gemisch von Bakterien durch das Loch in dem oberen Ende jedes Eies gespritzt. Darauf wurden die äusseren Becher wieder über die inneren gestülpt. Die Versuche fanden bei Laboratoriumstemperatur statt.

Die Resultate dieser Experimente waren stets übereinstimmend. Die Bakterien unterliessen es nie durch die Eischale hindurchzudringen, während nicht infizierte Kontrollversuche sterilisiert blieben. Das Eindringen wurde durch das Erscheinen von Bakterienkolonien auf der Aussenfläche der Eischale in der Gelatine erwiesen. Es schienen gewöhnlich viele Kolonien zu gleicher Zeit ziemlich regelmässig über die Oberfläche der Gelatine verbreitet. Aus dem Umstande, dass in einigen Fällen Gasblasen erzeugt wurden, in anderen aber nicht, wie auch aus dem Unterschiede in der Färbung und dem Wachstum der Kolonien, ging mit Sicherheit hervor, dass mehr als eine Bakterienart durch die Eischalen gedungen waren.

Die Schnelligkeit des Durchdringens selbst war verschieden. Im Durchschnitt erforderte es ca. vier Tage. Die Schwankungen in der Geschwindigkeit beim Durchgehen durch die Eischalen rührten zweifellos von Unterschieden in der

Dicke und der Struktur der Schalen her, denn als mehrere Experimente zu gleicher Zeit in Gang gebracht und mit denselben Bakterienmischungen infiziert worden waren, stellte es sich heraus, dass die zum Durchdringen erforderliche Zeit zwischen 3 bis 8 Tagen schwankte. Lind¹⁾ hat neuerdings Versuche über das Eindringen von Pilzen, namentlich *Botrytis* und *Penicillium*, durch Eischalen unternommen. Er fand, dass 8 bis 14 Tage zum Durchdringen nötig waren. Daher möchte es scheinen, dass Bakterien rascher als die obenerwähnten Pilze durch Eischalen hindurchzugehen vermögen.

Um die Art und Weise des Passierens der Bakterien durch die Eischalen auseinander zu setzen, ist eine Betrachtung des Baues der letzteren notwendig. Nach der von Nathusius²⁾ gegebenen Beschreibung besteht die Schale des Eies aus drei Hauptschichten, einer inneren Faserschicht, einer mittleren stark verkalkten und einer äusseren sehr dünnen Schicht. Die Faserschicht setzt sich aus Lagen von dicht verflochtenen Fasern zusammen; die Zwischenräume zwischen den letzteren sind mit Luft gefüllt. Wo die faserige Schicht das Eiweis berührt, bildet sich eine sehr dünne homogene Membran.

Die verkalkte Schicht, welche den grösseren Teil der Schale darstellt, zeigt eine durchscheinende Grundsubstanz. In dieser finden sich zahlreiche dünne undurchsichtige Felder eingebettet, die nach der Schalenoberfläche zu eine begrenzte Ausdehnung haben. Diese Felder bestehen aus kleinen dicht zusammengepressten Körnern von Calciumsalzen. Die Grundsubstanz ist zum Teil organisch, enthält jedoch eine beträchtliche Menge von Calciumsalzen wahrscheinlich in organischer Zusammensetzung. Bei einem Querschliff ähnelt dieser Teil der Schale einer Mauer aus Ziegelsteinen. Wo die Kalkschicht die Faserschicht berührt, entsendet sie Fortsetzungen in die letztere; diese Fort-

¹⁾ Lind, Über das Eindringen von Pilzen in Kalkgesteine und Knochen. *Jahrb. f. wiss. Bot.* Bd. XXXII, 1898, p. 260.

²⁾ Nathusius, Über die Hüllen, welche den Dotter des Vogeleies umgeben. *Zeitschr. f. wiss. Zoologie.* Bd. 18.

setzungen sind als Mammillae bekannt. Zwischen ihnen befinden sich Lufträume; diese werden mit der äusseren Schicht der Schale durch Porenkanäle verbunden, welche die Kalkschicht rechtwinklig durchsetzen. Die Durchmesser der Kanäle variieren zwischen ca. 29 μ und 10 μ . Die äussere Schicht der Schale, die sehr dünn ist und meist aus organischen Substanzen besteht, legt sich über die äusseren Mündungen der Porenkanäle. Nach Nathusius sind diese Porenkanäle als gefüttert und teilweise gefüllt mit Fortsetzungen zu betrachten, die sich von der äusseren Schicht der Schale in sie hinein erstrecken. Er entdeckte, dass die frische Eischale für Luft und Wasser selbst unter bedeutendem Drucke undurchdringlich blieb, dass aber beide unter einem sehr geringen Druck rasch durch die Schale traten, nachdem diese getrocknet worden.

Es war nicht möglich, das Hindurchgehen der Bakterien durch die Schale direkt zu beobachten. Um aber hindurch zu gelangen, mussten die Bakterien zuerst, wie es der oben beschriebene Bau der Eischale lehrt, die homogene Membran passiert haben, die dem Eiweiss anliegt und den inneren Abschluss der Faserschicht bildet. War die Membran durchbohrt, so konnten die Bakterien auf ihrem Wege zwischen den Fasern hindurch in die Lufträume zwischen den Mammillen hinein kein Hindernis finden. Die Lufträume, die sich wahrscheinlich mit Flüssigkeit angefüllt hatten, führen in die Porenkanäle. Anscheinend waren diese als direkter Durchgang zu der äusseren Schicht der Schale benutzt worden, welche im wesentlichen aus organischer Substanz besteht. Diese dürften die Bakterien wohl zu zerstören im stande gewesen sein, um so ihren Weg in die Gelatine zu finden. Die Annahme, dass die Porenkanäle die Bahn durch die dicke Kalkschicht abgaben, wird durch die augenfällige Übereinstimmung der Verteilung der Porenmündungen über die Schale des Eies mit der Verteilung der Bakterienkolonien über die Gelatine unterstützt.

Das Faulen der Eier muss Bakterien zugeschrieben werden, die von aussen her vermittelt Durchbohrung der

Eischale in die Eier gelangen. Der erste für den Eintritt in ein Ei erforderliche Schritt ist augenscheinlich das Überwinden der äusseren Schicht der Schale. Ist dieses erreicht, so werden wahrscheinlich die Porenkanäle als Durchlass benutzt, um nun direkt in die Faserschicht zu gelangen. Bevor dann die Bakterien an den Inhalt des Eies kommen, muss erst die sehr dünne homogene Membran durchsetzt werden, die sich an das Eiweiss anlegt. Sind diese Annahmen richtig, so geht daraus hervor, dass Bakterien, um die Eischale zu durchdringen, nicht gezwungen sind, die Kalksalze durch Ausscheidung von Säuren aufzulösen.

Die Gründe für das Eindringen von Bakterien durch die Schale des Eies liegen bei meinen Experimenten nicht so klar, wie bei Linds Versuchen für die Pilze (*loc. cit.*). Pilze durchsetzen eine Eischale als Einzelwesen und ihr Weg durch die Schale lässt sich direkt sehen. Bei den Bakterien kann man nur von Kolonien sagen, dass sie durch die Schale hindurchgehen, und auch sie können nicht so leicht beobachtet werden. Lind fand, dass es die Nährgelatine war, welche bei Experimenten ähnlich den von mir ausgeführten, die Pilze veranlasste, auf chemotropische Reize durch Eischalen hindurchzuwachsen. Zweifellos entwickelten sich die Bakterienkolonien bei den Experimenten am stärksten in der Richtung nach der Gelatine zu, woher die meiste Nahrung zu erlangen war. Daher ist man berechtigt anzunehmen, dass es die Nährgelatine war, welche das Hindurchwachsen der Bakterienkolonien durch die Eischale herbeiführte.

Zum Schluss erfülle ich die angenehme Pflicht, meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Geh. Hofrat Prof. Dr. W. Pfeffer meinen wärmsten Dank für die freundliche Unterstützung bei der Ausführung dieser Arbeit und für das mir stets erwiesene Wohlwollen auszusprechen. Ebenfalls bin ich Herrn Dr. Klemm für die mir immer bereitwilligst erteilten Ratschläge zu grossem Dank verpflichtet.

V i t a.

Ich, Arthur Henry Reginald Buller, Sohn des Rechtsanwalts Alban Gardiner Buller und seiner Gattin Mary Jane geb. Huggins, bin am 19. August 1874 in Birmingham, England, geboren.

Ich bin in der evangelischen Religion erzogen. Meine Vorbildung erhielt ich in „Queen's College“ Taunton. Im Wintersemester 1890—91 bezog ich „The Mason College“ zu Birmingham, woselbst ich im Jahre 1897 das Diplom „Associate of Mason College“ erlangte.

Im Juni 1892 wurde ich an der Universität zu London immatrikuliert. Im Herbst 1896 promovierte ich als „Bachelor of Science“.

Im Oktober 1897 liess ich mich an der Universität zu Leipzig immatrikulieren und arbeitete unter Herrn Geh. Hofrat Prof. Dr. Pfeffer im botanischen Institut. Im Juni 1898 erhielt ich das Reisestipendium „1851 Science Research Scholarship.“

Während meiner Leipziger Studienzeit besuchte ich die Vorlesungen der Herren Professoren Chun, Credner, A. Fischer, Marshall, Pfeffer und Zirkel.
